

J. Clin. Chem. Clin. Biochem.
Vol. 20, 1982, pp. 833–836

Determination of Urinary Oxalate by Isotachophoresis Practical Improvement and Critical Evaluation

By N. Schwendtner*, W. Achilles**, W. Engelhardt*, P. O. Schwille* and A. Sigel**

* Mineral Metabolism and Endocrine Research Laboratory, Department of Surgery, University of Erlangen, F.R.G.

** Mineral Metabolism and Endocrine Research Laboratory, Department of Urology, University of Erlangen, F.R.G.

(Received February 15/August 16, 1982)

Summary: We developed an electronic control unit for the determination of oxalate in urine by isotachophoresis with the LKB 2127 Tachophor. It permits a considerable reduction of the time required for analysis. Measurements were carried out in samples of untreated urine using different leading electrolytes and standardization procedures. Determination of oxalate can be thus achieved within 25 min, whereof the manpower expenditure is about 5 min. In the range of 1.0–0.1 mmol/l urinary oxalate can be determined with a coefficient of variation of 4–6%. The detection limit of the method is about 0.04 mmol/l.

Bestimmung von Urinoxalat durch Isotachophorese – Praktische Verbesserungen und kritische Bewertung

Zusammenfassung: Es wird ein Zusatzgerät zur Isotachophorese-Apparatur LKB 2127 Tachophor beschrieben, das eine Verkürzung der Analysenzeit zur Bestimmung von Oxalat im Harn ermöglicht. Oxalatbestimmungen wurden im nicht-vorbehandelten Urin mit verschiedenen Leitelektrolyten durchgeführt und unterschiedlich ausgewertet. Der Messung bei pH 2.3 (Leitelektrolyt enthält HCl und NaCl) ist wegen der größeren Effektivität und Richtigkeit der Vorrang zu geben. Eine Bestimmung erfordert 25 min bei einem tatsächlichen Arbeitszeitaufwand von etwa 5 min. Im Bereich 1,0–0,1 mmol/l Oxalat liegt der Variationskoeffizient zwischen 4 und 6%. Die Nachweisgrenze ist etwa 0,04 mmol/l.

Introduction

Oxalate metabolism is regarded as a key factor in the pathophysiology of recurrent calcium oxalate urolithiasis. The spectrum of techniques for measurement of urinary oxalate (colorimetry, gas chromatography, enzymatic tests) has recently been extended by isotachophoresis (1–3). According to Tschöpe et al. (3), oxalate can be determined directly in the urine without any extensive pre-treatment of the samples. Accompanying anions in the same urine sample can be measured too. However, isotachophoretic analyses have hitherto been too time-consuming, especially when, to improve the detection of an ion, a very low current is used. Reduction of the analysis time is possible when the isotachophoretic run is started with a relatively high current and the current is reduced during the run until the detection level is reached. If this is done manually the run must be supervised throughout the entire period. In the present paper we describe a unit that can bring about stepwise current reduction and, in addition, initiate recording of the chosen signal. Further attempts were made to improve the method by using different leading electrolytes and methods of standardization, as well pretreating the sample by cation exchange.

Materials and Methods

For isotachophoresis a 2127 Tachophor (LKB, Bromma, Sweden) was used which was equipped with a 230 mm teflon capillary tube. All chemicals, if not otherwise stated, were of analytical grade or suprapure. The leading electrolytes were

(I) 5 mmol/l HCl (suprapur; Merck, Darmstadt, FRG), 1 mmol/l NaCl (Merck) and 0.3 g/l Methocel M 4000 cp (Fluka, Ulm, FRG), pH 2.3;

(II) 10 mmol/l HCl titrated with β -alanine to pH 3.85 and Methocel as in I.

The terminating electrolyte was 20 mmol/l acetic acid. For cation exchange experiments Amberlite IRC-75 was used in the H⁺-form (Serva, Heidelberg, FRG).

Urine samples for measurement were prepared by adding 10 μ l of

- 1 mol/l HCl,
 - as in a) + 0.2 mmol/l oxalic acid,
 - as in a) + 0.4 mmol/l oxalic acid
- to every 100 μ l of urine.

4 and up to 8 μ l of these samples were injected for isotachophoresis which was performed in two different ways:

- with a constant current (75 μ A) from injection until detection,
- with a starting current of 325 μ A which was stepwise reduced down to 75 μ A by the unit described below.

Description of the control unit

When isotachophoresis is performed with a constant current, the current is determined by a voltage divider, which is set by a switch. After presetting a high-voltage threshold, whose level depends on sample volume and leading electrolyte, and which must not be exceeded, the control logic initiates the isotachophoretic run with a current that is maximal in relation to this threshold. During the further run, each time the threshold is reached the current is reduced by 50 μA down to a pre-set detection current (see fig. 1). When the thermosignal appears, the recorder is switched on by the unit for recording the UV-signal. Thereafter, either the high voltage of the Tachophor is switched off, for example when only oxalate is to be measured, or the rest of the tachogram is recorded with a pre-set current. In both cases the recorder is switched off automatically after a pre-selected period of time.

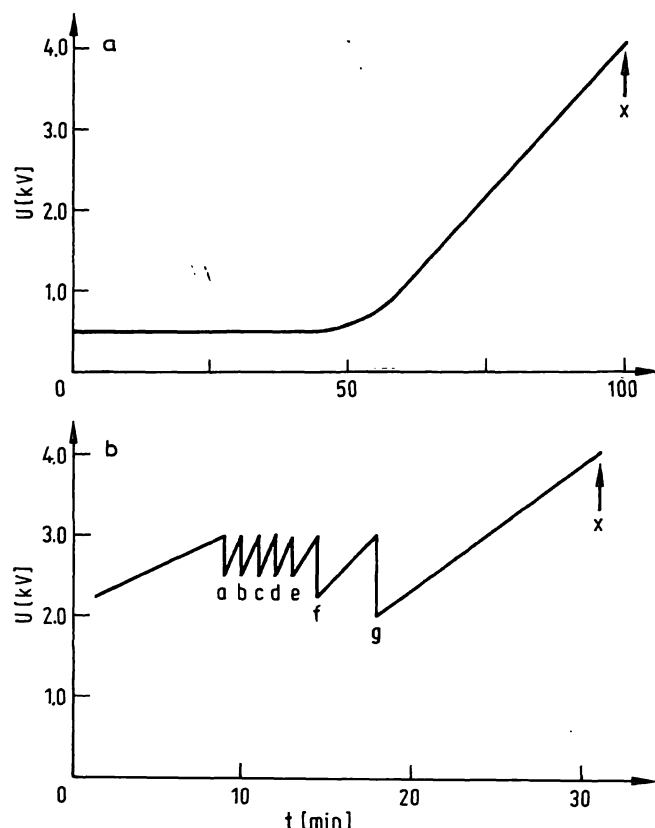


Fig. 1. Simplified voltage diagram of isotachophoretic determination in urine:

- a) with constant current (75 μA) from injection of the sample and detection,
- b) with controlled current (control unit);
- a–g = times of current reduction;
- X = time of recording.

Note the different time scales in a) and b).

Results

Principles of oxalate measurement

By using the control unit described above the time for isotachophoretic analysis of urinary oxalate could be reduced by 50–70% compared with the mode of analysis using low constant current throughout the whole run. In comparison with the procedure, in which reduction of the current to the detection level is performed manually, the time required for supervising the process was decreased by about 80%. Isotachograms

obtained with and without the unit are identical, i.e. the detection procedure itself is not influenced. To attain further improvement in the determination of oxalate, especially a higher efficiency, measurements were carried out in pooled human urine with two leading electrolytes (I and II). From these measurements, unknown concentrations of urinary oxalate were determined by two different methods of standardization (see fig. 2). The zone lengths corresponding to oxalate in the acidified urine were referred to

A) that obtained from an aqueous standard solution (1 mmol/l oxalic acid and 5 mmol/l HCl),

B) those obtained from samples of the same urine containing additional oxalate (= standard addition procedure).

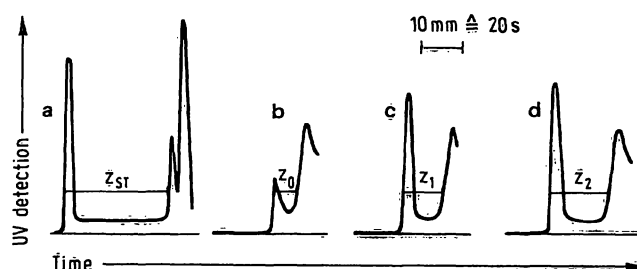


Fig. 2. Selected isotachograms of oxalate obtained from

- a) aqueous standard solution (1 mmol/l oxalate + 5 mmol/l HCl),
- b) pooled urine + 0.1 mol/l HCl),
- c) solution b) + 0.2 mmol/l oxalate,
- d) solution b) + 0.4 mmol/l oxalate.

Leading electrolyte I was used (see Material and Methods), and the injection volume was 4 μl . The zone length for evaluation (= z) is indicated in each isotachogram.

This is expressed by the following relationships:

$$\text{A) } c_o = \frac{z_o}{z_{St}} \cdot c_{St} \cdot f, \text{ or } c_o = \left\{ \frac{z_o}{z_{St}} \cdot c_{St} - c_A \right\} \cdot f, \text{ and}$$

$$\text{B) } c_o = \frac{c_A \cdot z_o}{z_A - z_o} \cdot f, \text{ where}$$

c_o, c_{St}, c_A = concentrations of oxalate in the urine (c_o), in the aqueous standard (c_{St}) and standard added to the urine (c_A);

z_o, z_{St}, z_A ($= z_1$ or z_2) = corresponding zone length of the isotachogram as shown in figure 2; f = dilution factor.

Criteria of oxalate measurement

The results of measurements in pooled human urine and samples with two representative additions of external oxalate are summarized in table 1. All results refer to the same urine.

As may be seen from the table, when using the leading electrolyte I (pH 2.3), evaluation of the data corresponding to A) and B) gives results which do not differ considerably one from another. The values obtained by method A) exhibit higher reproducibility than those

Tab. 1. Isotachopheretic measurement of oxalate in pooled urine with and without oxalate added.

I, II: measurement with leading electrolyte I or II, respectively (see methods); A, B: calculation of results referring to (A) 1 mmol/l aqueous oxalate standard, (B) oxalate added to the urine, (1) from zone lengths z_0 and z_1 , (2) z_0 and z_2 (see fig. 2); SD = standard deviation, CV = coefficient of variation.

Leading electrolyte	Evaluation method	Values	Oxalate concentration in pooled urine mmol/l			Time per one isotachopheretic run min
		n = 5–10	c_0 —	c_1 (0.2 mmol/l added oxalate)	c_2 (0.4 mmol/l added oxalate)	
I	A	Mean \pm SD	0.270 \pm 0.016	0.462 \pm 0.017	0.655 \pm 0.035	25
		CV (%)	5.9	3.8	5.3	
	B	Recovery of added oxalate (%)	—	96	96	2 \times 25
		(1) Mean \pm SD	0.290 \pm 0.028	0.483 \pm 0.059	—	
		CV (%)	9.8	12.2	—	
		(2) Mean \pm SD	0.286 \pm 0.036	—	—	
II	A	CV (%)	12.5	—	—	12
		Mean \pm SD	0.138 \pm 0.005	0.284 \pm 0.005	0.430 \pm 0.01	
	B	CV (%)	3.9	1.8	2.3	2 \times 12
		Recovery of added oxalate (%)	—	73	73	
		(1) Mean \pm SD	0.193 \pm 0.016	0.420 \pm 0.039	—	
		CV (%)	8.3	6.9	—	
	B	(2) Mean \pm SD	0.198 \pm 0.016	—	—	
		CV (%)	8.1	—	—	

obtained by method B). The detection limit (= blank value + 4 SD) is about 0.04 mmol/l with an injection volume of 8 μ l.

The data from the system with leading electrolyte II demonstrate that the calibration corresponding to A) leads to crude systematic errors. Reasonable results could only be obtained by using the standard addition procedure (see above). In addition, the mean values of urinary oxalate resulting from this principle of measurement were significantly lower than those when leading electrolyte I was applied.

Another improvement of oxalate measurement by isotachopheresis was attempted by pre-treatment of urine samples with the H^+ -loaded cation exchanger Amberlite IRC-75; 0.25 ml resin (capacity about 1 mmol) was mixed with 1 ml pooled urine in order to completely remove metal ions from the solution. This should prevent interference by complex formation between Ca^{2+} or Mg^{2+} and oxalate during the analysis. No significant effect on the isotachogram could be observed after such pre-treatment of samples (data not shown).

Discussion

Until now, the isotachopheretic determination of oxalate in urine has not been very common, although

this technique permits measurement without pre-treatment of the samples (3). One of the underlying reasons is the long time required for one determination. Using the control unit described above considerable time of the analyses or supervision of the process can be saved.

As shown in table 1, further reduction of analysis time can be achieved by applying a leading electrolyte of higher pH. However, the recovery of added oxalate in this system is so unsatisfactory that the standard addition procedure outlined in the section on methods should be practiced in order to obtain accurate oxalate concentrations in urine. This disadvantage, however, abolishes the advantageous time saving effect mentioned above.

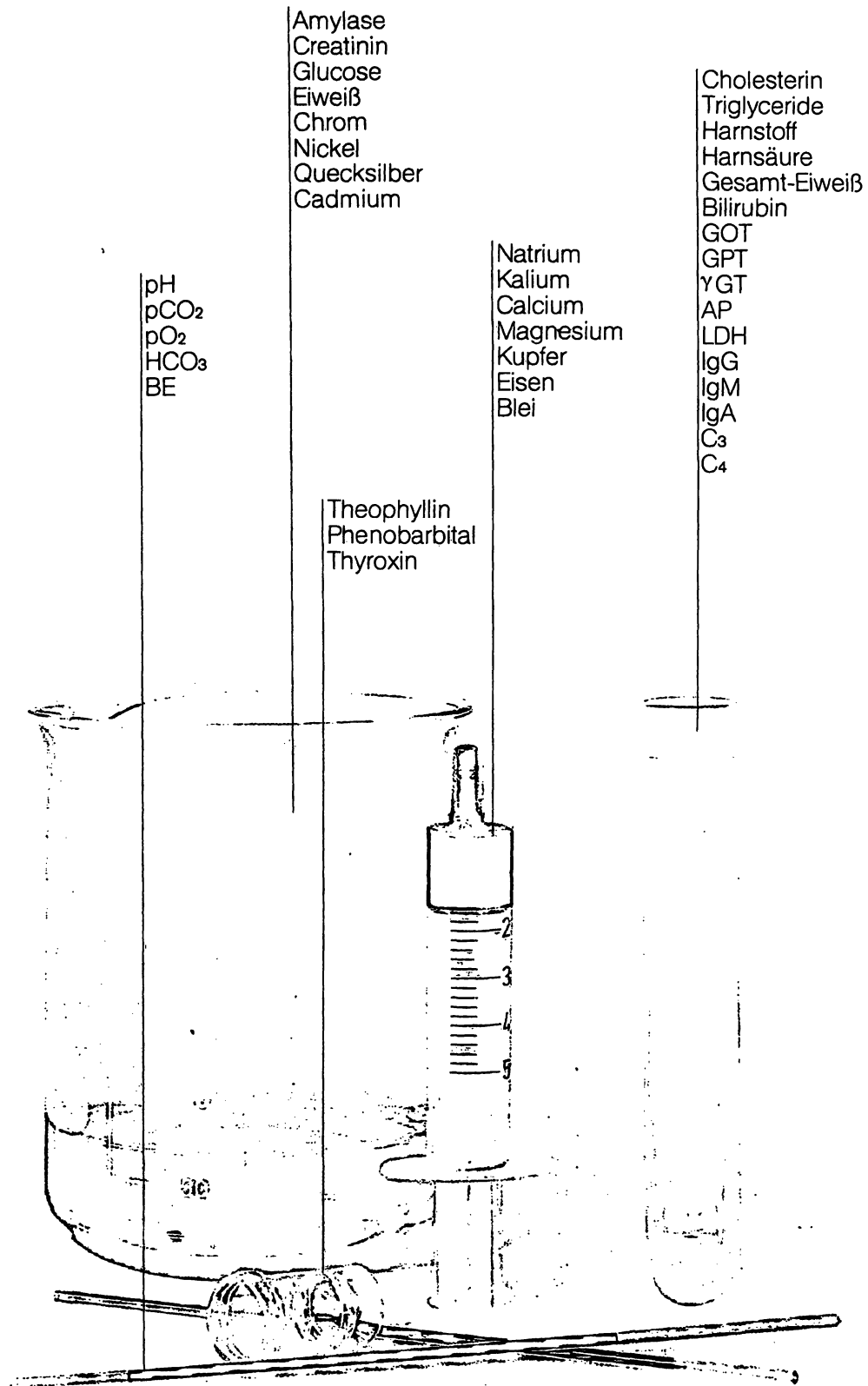
Reliable results were obtained by employing the leading electrolyte I. This can be seen from the percentage recovery of added oxalate, the reasonable agreement of the data resulting from two different calibration procedures, and the variation coefficients between 4 and 6% in the concentration range of interest (tab. 1). In a preliminary communication (4) we found daily excretion of oxalate in urine of normals to be in the range of 0.15–0.55 mmol (= 13.5–49.5 mg) per 24 h. Taking all data together the method may be recommended for the measurement of oxalate in studying oxalate physiology and pathophysiology.

References

1. Schmidt, K., Hagmaier, V., Bruchelt, G. & Rutishauser, G. (1980) *Urol. Res.* 8, 177–180.
2. Schmidt, K., Hagmaier, V. & Bruchelt, G. (1980) in: *Biochemical and Biological Applications of Isotachophoresis* (Adam, A. & Schots, C., eds.) Elsevier, Amsterdam, p. 109.
3. Tschöpe, W., Brenner, R. & Ritz, E. (1981) *J. Chromatogr.* 222, 41–52.
4. Hanisch, E., Scholz, D., Schwille, P. O., Sörgel, F. & Sigel, A. (1982) in: *Pathogenese und Klinik der Harnsteine IX* (Vahlen-sieck, W. & Gasser, G., eds.) Steinkopf, Darmstadt, in press.

Prof. Dr. Dr. P. O. Schwille
Universitäts-Krankenhaus
Chirurgische Klinik
Maximiliansplatz
D-8520 Erlangen

Was müssen Sie sonst noch analysieren?



**Instrumentatic
Laboratory**

Das große Programm für individuelle Lösungen.

Ob Normalroutine oder Notfallanalyse, ob Standard- oder Spezialuntersuchungen – IL bietet Ihnen Lösungen für Ihre Analysenprobleme.

Vier in Eins.

Der IL Multistat III-F/LS vereinigt erstmals vier optische Meßprinzipien in einem System:

1. Absorptionsphotometrie
2. Turbidimetrie
3. Fluorometrie
4. Nephelometrie

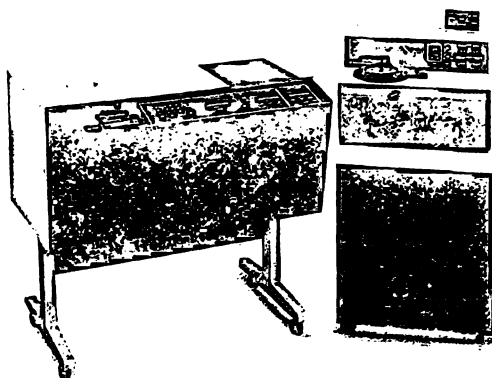
Durch die verschiedenen Meßmethoden ergibt sich eine Vielzahl von Einsatzmöglichkeiten in der klinischen Chemie, der Gerinnungsanalytik, der Toxikologie und Pharmakologie und in der Lebensmittelanalytik. Der geringe Probenverbrauch (2–25 µl) macht das Gerät besonders auch für Pädiatrie, Geriatrie und die Tiermedizin interessant.

Nicht nur die Normalroutine, sondern auch Spezialuntersuchungen werden vollmechanisiert, computergesteuert durchgeführt.

Die Fluoreszenz-Einrichtung erlaubt den Einsatz von homogenen Fluoreszenz-Immuno-Assay (FIA) Techniken, z. B. zur Bestimmung des Serum-Medikamentenspiegels. Neue spezifische Analysenmöglichkeiten, z. B. die Bestimmung der Gesamt-Gallensäuren, die kinetische Bestimmung der Sauren Phosphatase oder anderer spezieller Enzyme werden ermöglicht.

Die kinetische Turbidimetrie und Nephelometrie läßt einen hohen Analysendurchsatz von bestimmten Plasmaproteinen zu.

Der IL Multistat III-F/LS führt ca. 250 Tests pro Stunde bei geringen Kosten (Reagenzienverbrauch pro Test 100–200 µl) durch. Leichte Bedienung und Dokumentation der Ergebnisse durch den eingebauten Drucker sind selbstverständlich. Die Analysenprogramme sind auf Kassetten gespeichert und jederzeit erweiterbar.



IL Multistat III-F/LS

Die folgenden Kurzbeschreibungen geben Ihnen einen ersten Eindruck der Leistungsmöglichkeiten unserer Analysengeräte. Selbstverständlich lassen sie sich untereinander kombinieren oder vielfältig erweitern. Zubehör und benötigte Reagenzien finden Sie ebenfalls in unserem Programm für das Labor.

Schnell und selektiv.

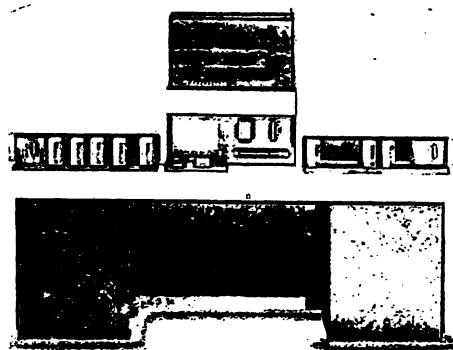
Das IL504/508 Elektrolyt/Substrat-Analysensystem führt bis zu 800 Bestimmungen pro Stunde durch. Wahlweise können Natrium, Kalium, Chlorid, Gesamt CO₂ oder Glucose, Harnstoff, Creatinin, Gesamteiweiß oder Calcium oder alle 8 Parameter bestimmt werden. Variable Ausbaumöglichkeiten lassen Ihnen die Wahl zwischen 4, 6, 7 oder 8 Parametern.

Das Parameter-Programm ist voll selektierbar und dadurch besonders wirtschaftlich, denn ein Reagenzienverbrauch für nicht angeordnete Bestimmungen wird so vermieden. Durch Mikroproben- und Mikroreagenzien-Volumina werden die Kosten pro Test zusätzlich extrem niedrig gehalten.

Die Bestimmung der angewählten Parameter erfolgt über modernste methodische Technologien. Die Natrium- und Kalium-Bestimmung wird mit ionenselektiven Elektroden durchgeführt, die keinen Membranwechsel mehr erfordern und leicht austauschbar sind.

Durch den geringen Wartungsaufwand und die kontinuierliche automatische Probenzuführung ist das Gerät praktisch permanent einsetzbar. Serum-, Plasma- oder Urinproben können sowohl in der Routine- als auch in der Notfallanalyse durchgeführt werden.

Wie alle IL-Geräte zeichnet sich auch das Elektrolyt/Substrat-Analysensystem durch einfachste Bedienung aus. Der eingebaute Bildschirm zeigt Testergebnisse sowie systemdiagnostische Informationen und gibt zusätzlich Bedienungshinweise und Fehleranzeigen.



IL508

Alle IL-Geräte sind für den Anschluß an zentrale Datenverarbeitungsgeräte vorbereitet. Hoher Probendurchsatz und größte Meßgenauigkeit sind ebenso wie die leichte Handhabung Vorteile, die für IL-Geräte sprechen!

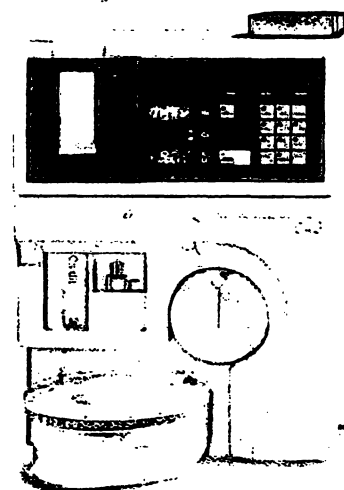
Neue Maßstäbe in der Flammenphotometrie.

Durch das Flammenphotometer IL943 erhält die Referenzmethode Flammenphotometrie neue beeindruckende Argumente.

Das IL943 bestimmt Natrium, Kalium und Lithium aus nur 20 µl Probe mit automatischer Verdünnung über einen eingebauten Kolbendilutor. Die Mitführung eines internen Cäsium-Standards sorgt für optimale, präzise Lithium-Bestimmungen, wobei Spül- und Reinigungs Vorgänge gänzlich entfallen.

Die Verwendung des Kolbendilutors verhindert Verstopfungen. Dieser wesentliche Vorteil sowie die leichte Bedienbarkeit lassen das IL943 zum notwendigen Bestandteil Ihrer Routineanalysen werden. Die Probenart – Serum, Urin oder sonstige biologische Flüssigkeiten – wird leicht über eine Eingabetastatur programmiert. Bis zu 100 Proben pro Stunde und die Möglichkeit, Notfallanalysen zwischen den Routineanalysen schnell durchzuführen, sind überzeugender Beweis für die Leistungsfähigkeit des Systems.

Automatische Zweipunktkalibrierung für Natrium, Kalium und Lithium sind selbstverständlich, ebenso wie die vielfältigen Ausbaumöglichkeiten. So kann das IL943 mit oder ohne integriertem Drucker geliefert werden. Ein automatisches Probenzuführungssystem gehört ebenfalls zu den Ausbaustufen.



IL943

ordern Sie mit umseitiger Antwort-
arte ausführliche Informationen oder
eine Gerätevorführung an!

Vollautomatische Blutgasanalyse.

Mit den Blutgasmodellen IL1302 und IL1303 stehen zwei vollautomatische Systeme zur Verfügung, die durch ihre richtungsweisende Konzeption in jedem modernen Labor ihren Platz finden.

Größte Präzision, selbst bei kleinsten Probenvolumina, und hohe Zuverlässigkeit sind bestimmend für ihre Leistung.

Sowohl im Routine- wie auch im Notfallbetrieb zeichnen sich beide Geräte durch leichte Handhabung aus. Ein komplettes Blutgas-Qualitätskontrollprogramm von IL, bestehend aus Kontrollmaterialien und Auswertung, gibt Ihnen die erforderliche Sicherheit.

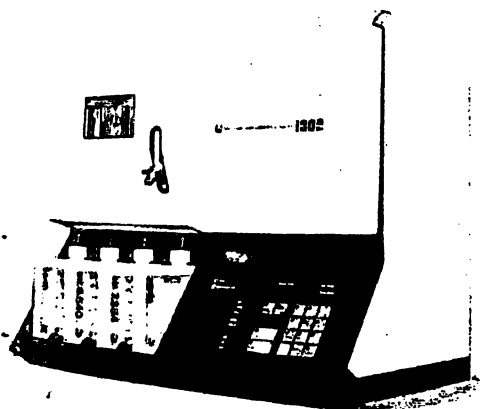
Die von IL entwickelten neuartigen Elektroden reduzieren die Wartungsarbeiten und -kosten auf ein Minimum.

Der eingebaute Thermodrucker dokumentiert Datum, Uhrzeit, Kalibrierdaten und Meß- und Rechenwerte.

Zusätzlich verfügt das IL1303 über einen Bildschirm zur Anzeige weiterer Patienteninformationen und Anleitung für die Durchführung von Wartungs- und Service-Checks.

Durch die Adaption eines IL282 CO-Oximeters an den Blutgasanalysator erhalten Sie zusätzlich gemessene Hämoglobin-, Sauerstoffsättigungswerte und weitere Hb-Derivate. Alle Daten werden über den Drucker des Blutgasanalysators ausgedruckt.

Mit den Blutgasmodellen von IL legen Sie den Grundstein für ein ausbaufähiges, leistungsstarkes Blutgasanalysezentrum.



IL1302

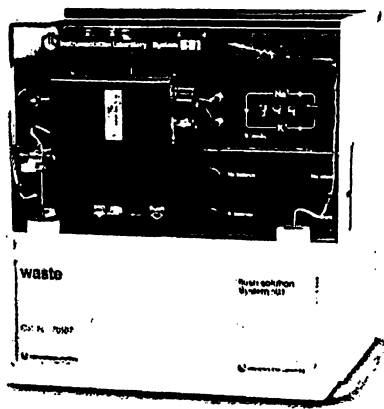
Elektrolytbestimmung ohne Flamme.

Mit den neuen ionenselektiven Elektrolytssystemen IL501 und IL502 können Sie jetzt ohne Flamme, Propan- oder Acetylgas und Druckluftversorgung eine exakte Bestimmung der Elektrolyte Natrium und Kalium vornehmen.

Die kompakte Ausführung und die Bedienungsfreundlichkeit machen diese Modelle zur idealen Ergänzung Ihres Labors – als Routine- oder als Notfallsystem.

Die neuartige Elektrodenkonzeption reduziert die erforderlichen Wartungsarbeiten und -kosten auf ein Minimum. Sie können zwischen Vollautomat (IL502) oder Halbautomat (IL501) wählen – und sich so preisgünstig für das Gerät entscheiden, das Ihrem Bedarf bestmöglich angepaßt ist.

Durch den ständig betriebsbereiten Zustand beider Systeme wird eine sofortige Diagnostizierung Ihrer Patienten möglich. Als Probenmaterial kann Vollblut, Plasma, Serum oder Urin verwandt werden.



IL501

Atom-Spektroskopie in der klinischen Chemie.

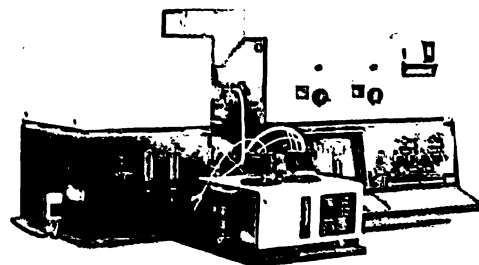
Die Methode der Atom-Spektroskopie wird immer häufiger in klinisch-chemischen Laboratorien routinemäßig eingesetzt.

Die Anwendungsbreite der Atom-Spektroskopie ist dank Ihrer Spezifität und geringen Störanfälligkeit so groß, daß sie für alle klinisch-chemischen Problemstellungen eingesetzt wird, wenn es um die Analyse von Metallen geht.

Das klassische Analysenprogramm der klinischen Chemie erfährt auch hinsichtlich des Probenmaterials eine Ausweitung. Es werden außer den Körperflüssigkeiten Blut, Urin, Magensaft, Liquor cerebrospinalis auch Gewebe als Untersuchungsmaterialien eingesetzt, da diese heute durch Punktion einfach zu erhalten sind.

Für die Analyse von Metallen in der klinischen Chemie bietet IL ein vollständiges Programm für alle Anwendungsprobleme. IL Atom-Spektrophotometer sind so konzipiert, daß maximale Leistung und besonders gute Nachweis-Empfindlichkeiten erreicht werden. Alle Modelle enthalten die gleiche, besonders lichtdurchgängige Optik, ein Brennersystem mit ausgefeilten Sicherheitseinrichtungen und integrierte Computer-Steuerung.

Auch für die flammenlose Atom-Absorption, die z. B. für die quantitative Bestimmung essentieller Spurenelemente und toxikologisch interessanter Schwermetalle, wie Pb, Cd, Hg oder Tl, eingesetzt wird, hat IL das richtige Zubehör.



IL AAS

Das umfassende Programm **für Ihr Labor.**

IL Multistat III-F/LS für Enzym- und Substratbestimmungen sowie spezielle Untersuchungen.

IL504/508 für die häufigsten Routineanalysen.

IL943 für die moderne Flammenphotometrie.

IL1302/1303 für die vollautomatische Blutgasanalyse.

IL501/502 für die problemlose Natrium/Kalium-Bestimmung

IL AAS für die präzise Metallanalyse.

Fordern Sie ausführliche Informationen mit untenstehender Antwortkarte an!

Ich interessiere mich für

- ☐ Analysenautomat IL Multistat III-F/LS
- ☐ Elektrolyt/Substrat-Analysensystem IL 504/508
- ☐ Flammenphotometer IL 943
- ☐ Blutgasmodelle IL 1302/1303
- ☐ Ionenselektive Elektrolytsysteme IL 501/502
- ☐ IL Atom-Absorptions-Spektroskopie

Ich bitte um

- ☐ ausführliches Informationsmaterial
- ☐ Besuch Ihres Fachberaters
- ☐ Gerätevorführung

Datum

Unterschrift



**Instrumentation
Laboratory**

Instrumentation Laboratory GmbH
Kleinstraße 14
D-5303 Bornheim 2
Deutschland
Telefon 0 22 22 / 83 10
Telex 8 869 361

Instrumentation Laboratory Ges.m.b.H.
Linke Wienzeile 130 a
A-1060 Wien
Österreich
Telefon 0222 / 57.83.88 – 57.83.89
Telex 135 408 ILA

Dr. W. Ingold AG
Industriezone Nord
CH-8902 Urdorf-Zürich
Schweiz
Telefon 01 / 7 34 38 00